



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE MICROANÁLISE
DUPLA MEDIADA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS ATIVIDADES
INIBITÓRIAS DE FENÓLICOS FRENTE ÀS ENZIMAS
ACETILCOLINESTERASE E α -GLICOSIDASE**

JULIANA SOARES CAMPOS

Florianópolis
Novembro/2018

Juliana Soares Campos

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE MICROANÁLISE
DUPLA MEDIADA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DAS ATIVIDADES
INIBITÓRIAS DE FENÓLICOS FRENTE ÀS ENZIMAS
ACETILCOLINESTERASE E α -GLICOSIDASE**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512).

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Me. Diogo Alexandre Siebert

Florianópolis
Novembro/2018

Dedico este trabalho a Deus que foi surpreendente durante esta caminhada. A minha mãe, que me cuidou e me deu forças para seguir. A meu noivo, por toda paciência e amor. A minha avó Nilza, que infelizmente foi diagnosticada com mal de Alzheimer. E a todos que estiveram perto de mim, fazendo com que este momento fosse único.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, por todo incentivo durante essa jornada, por todos os conselhos e cuidados. Ao meu noivo Everton por todo apoio e carinho nos dias difíceis.

Meu eterno agradecimento ao meu Professor e orientador Dr. Gustavo Amadeu Micke, que me ensinou o prazer da pesquisa e fez eu me apaixonar por eletroforese capilar.

Agradeço também ao meu amigo e coorientador Me. Diogo Alexandre Siebert por todos os ensinamentos, por todas as horas dedicadas a este trabalho, e pela amizade sincera que nasceu junto com este projeto.

A todos os meus amigos do laboratório LABEC, meu muito obrigado pela amizade e pela parceria.

E agradeço também a UFSC, CNPq, CAPES e ao INCT catálise, que me proporcionaram a chance de expandir os meus conhecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Doença de Alzheimer.....	10
2.2 Diabetes <i>Mellitus</i>	10
2.3 Eletroforese Capilar.....	11
2.3.1 <i>Instrumentação</i>	12
2.3.2 <i>Peakmaster</i>	13
2.3.3 <i>Injeções Múltiplas</i>	14
2.3.4 <i>Microanálise Mediada por Eletroforese Capilar (EMMA)</i>	14
2.4 Parâmetros Cinéticos da Reação Enzimática.....	16
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Reagentes.....	20
4.2 Instrumentação.....	20
4.2.1 <i>Peakmaster</i>	20
4.3 Método.....	21
4.4 Resíduos.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Método.....	24
5.2 Parâmetros Cinéticos.....	26
5.2.1 <i>Constantes Cinéticas K_m e V_{max}</i>	26
5.2.2 <i>Parâmetros de Inibição</i>	27
5.3 Compostos Fenólicos.....	30
6. CONCLUSÃO.....	34

7. REFERÊNCIAS.....	35
----------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

EMMA – do inglês, *Electrophoretically Mediated Microanalysis*

AChE – Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

α -Gli – α -Glicosidase

DA – doença de Alzheimer

EOF – do inglês, *Electroosmotic Flow*

AThCh – Acetiltiocolina

TCh – tiocolina

p-NPG – *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo

p-NP – *p*-nitrofenolato

BGE – do inglês, *background electrolyte*

MISER – do inglês, *multiple injections in a single experimental run*

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

PI – Padrão interno

ES – Enzima-substrato

ESI – Enzima-substrato-inibidor

EI – Enzima-inibidor

K_m – Constante de Michaelis

IC₅₀ – Metade da concentração inibitória máxima

RESUMO

A doença de Alzheimer e a diabetes *mellitus* são doenças que atingem grande parte da população, sendo de grande importância o estudo das mesmas. As enzimas acetilcolinesterase (AChE) e α -glicosidade (α -Gli), respectivamente, são responsáveis por reações biológicas que estão diretamente relacionadas a estas doenças. Com o avanço da ciência, cresce o estudo de desenvolvimento de novos métodos de análises e a busca por novos fármacos que possam inibir estas enzimas. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de análise simultânea em eletroforese capilar para as enzimas AChE e α -Gli, e a aplicação do método para a determinação de parâmetros cinéticos e de possíveis atividades inibitórias de fenólicos frente às enzimas. Os valores da K_m para AChE e para α -Gli foram $3,69 \text{ mmolL}^{-1}$ e $0,42 \text{ mmolL}^{-1}$, respectivamente. A neostigmina apresentou caráter de inibidor não-competitivo e a acarbose competitivo. A IC_{50} da neostigmina e da acarbose foram $5,35 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ e $0,57 \text{ mmolL}^{-1}$, respectivamente. Dentre os fenólicos estudados, os que mais apresentaram inibição frente à AChE foram o ácido protocatecuico e o ácido *p*-cumárico, e frente à α -Gli foram quercetina e ácido elágico. Os valores de K_m e IC_{50} estão em boa concordância com a literatura, e existem estudos que corroboram com as atividades inibitórias dos fenólicos.

Palavras-chave: *eletroforese capilar, acetilcolinesterase, α -glicosidase, fenólicos.*

1. INTRODUÇÃO

Desde que o homem tornou-se pensante, era muito comum o uso de plantas como alternativa para curar enfermidades e desconfortos. Mesmo sem saber os compostos químicos ou como ocorrem os mecanismos das reações dos princípios ativos da planta, o relato popular era a principal via de informação da sua eficácia. O método de análise era empírico, ou seja, tentativa e erro¹.

Com o passar dos tempos, dando um salto para a modernidade, viu-se que poderiam ser feitos testes mais seguros, sem que houvesse consequências negativas para as pessoas. Como por exemplo, os testes *in vitro* (onde são utilizados tubos de ensaio ou placas de Petri) e os *in vivo* (onde são utilizados animais, como por exemplo, camundongos).¹

Com o avanço da ciência, procuraram-se ferramentas analíticas para a análise desses princípios ativos, surgindo diversos métodos analíticos, dentre eles a microanálise mediada por eletroforese capilar (EMMA, do inglês *Electrophoretically Mediated Microanalysis*), como método alternativo para determinação de atividades biológicas. Este método permite realizar ensaios enzimáticos no interior de um tubo capilar, utilizando reagentes com volumes na ordem de nanolitros (nL), condizendo com alguns dos conceitos da química verde.²

Sabendo que a doença de Alzheimer³ e a diabetes⁴ são doenças que atingem grande parte da população, e a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) e da enzima α -glicosidase (α -Gli), provocam a melhora dessas enfermidades, este trabalho buscou o estudo de compostos que poderão inibir estas enzimas.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa verificaram que alguns sucos de frutas têm atividade inibitória contra as enzimas, e sabendo que os sucos são ricos em compostos fenólicos, buscou-se aprofundar o estudo para verificar se os compostos fenólicos presentes nos sucos são responsáveis por essa inibição enzimática, e quais compostos fenólicos são estes.⁵

Portanto, diante de todo exposto, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método de EMMA simultâneo para as enzimas AChE e α -

1 Gli, e a aplicação do método proposto na investigação de possíveis atividades
2 inibitórias por parte de compostos fenólicos selecionados.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa, onde morrem neurônios que liberam acetilcolina (ACh). Segundo Tang (TANG; WANG; KANG, 2007), foi estimado que entre 50 e 60% dos casos de demência em pessoas com 65 anos de idade são causados por DA. Com a morte de neurônios que liberam ACh, há um baixo nível deste neurotransmissor no sistema nervoso central, em áreas do cérebro que são associadas à memória.⁶

A acetilcolinesterase (AChE), desempenha um papel importante no sistema nervoso central, hidrolisando o neurotransmissor ACh. Assim, uma substância que inibe a hidrólise da ACh, causa um aumento dos níveis de ACh, estabilizando o quadro da doença.³

A AChE é então indicada como uma enzima alvo de fármacos para o tratamento da DA. Uma das possibilidades de tratamento da DA baseia-se na inibição da AChE por tacrina, donepezil, rivastigmina, galantamina, entre outros. Porém, há um efeito adverso desses medicamentos que limitam seus usos, sendo de grande importância o estudo de novos fármacos que realizem a inibição da enzima.⁷

2.2 Diabetes *Mellitus*

A diabetes *mellitus* é uma das doenças mais comuns do mundo, atingindo grande parte da população. A taxa de mortalidade tem aumentado com o passar dos anos. A diabetes é a terceira doença que mais mata no mundo, perdendo apenas para o câncer e para as doenças cardiovasculares.⁴

Quando nos alimentamos, há um pico de aumento da glicemia, devido aos carboidratos que são absorvidos no trato gastrointestinal, fígado e tecidos periféricos. Um dos fatores que controlam esse pico de glicemia é a quantidade e a cinética de enzimas que fazem a quebra dos carboidratos, como a α -glicosidase, aumentando o nível glicêmico.⁴

1 Com a inibição da α -glicosidase (α -Gli), reduz-se a taxa de absorção de
2 glicose através da digestão retardada de carboidratos, não há um pico glicêmico
3 após uma refeição, estabilizando o nível de açúcar no organismo do diabético.⁹

4 Os inibidores utilizados para a α -Gli são acarbose, voglibose, miglitol, entre
5 outros. A administração destes inibidores provoca efeitos adversos, sendo de grande
6 importância o estudo de novos compostos que inibem a enzima.⁹

7 **2.3 Eletroforese Capilar**

8 A eletroforese é uma técnica de separação que se baseia na diferença de
9 migração entre compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico.
10 A primeira publicação sobre eletroforese foi em 1930, na tese de Arne Tiselius,
11 usada para separar proteínas que estavam sendo descobertas desde o início do
12 século XX.^{10,11}

13 Pela má dissipação de calor, a técnica sofria diversas limitações, como por
14 exemplo, baixa resolução, pouca eficiência e pouca rapidez. Esse calor é gerado
15 pela passagem de corrente através do meio condutor, chamado de Efeito Joule. O
16 calor é gerado pelo condutor, porém não se dissipa de maneira uniforme, gerando
17 gradiente de temperatura. Esse fator também causa uma diferença de migração dos
18 compostos, devido ao efeito de dispersão nas bordas.^{11,12}

19 Com o passar dos anos, a eletroforese foi evoluindo, para que os efeitos
20 térmicos referentes ao campo elétrico aplicado fossem amenizados, resultando em
21 avanços que fazem com que a técnica atue com maior eficiência. Com o avanço
22 instrumental, introduziram-se colunas capilares no sistema e, então, a técnica
23 passou a ser chamada de eletroforese capilar.¹³

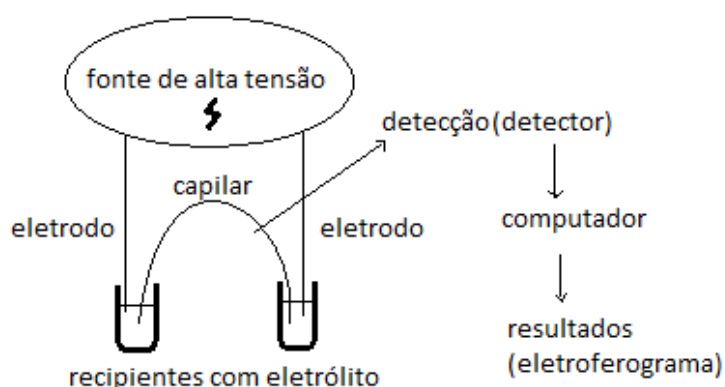
24 Com o uso de capilares de sílica fundida, há formação de um fluxo
25 eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*). A sílica é constituída por grupos
26 silanóis, que em um determinado pH se ionizam, deixando a parede do capilar
27 negativamente carregada e cargas positivas em solução. Quando um campo elétrico
28 é aplicado, causa um movimento de cargas que se movimentam em direção ao
29 eletrodo de carga oposta. Durante esse movimento, os íons carregam moléculas de
30 água, induzindo um fluxo na direção do cátodo (pólo negativo), gerando então o
31 fluxo eletrosmótico. Esse fluxo é que vai arrastar os analitos até o detector, sem

1 distinção de carga. Os analitos que não apresentam carga são arrastados com o
2 fluxo.¹⁴

3 **2.3.1 Instrumentação**

4 A instrumentação da eletroforese capilar é relativamente simples, como
5 mostrada na figura 1.

6
7 **Figura 1.** Esquema de instrumentação de eletroforese capilar.
8



9
10
11
12 Fonte: Autora.

13 A fonte de alta tensão (5 a 30 kV) é conectada aos recipientes que contêm o
14 eletrólito (solução tamponada e ionizada que conduz corrente) através dos eletrodos.
15 No capilar (diâmetro na ordem de micrometros) é onde ocorre a separação dos
16 compostos e, então, são detectados através do detector (espectrofotométrico de
17 absorção UV/Vis), por uma janela de detecção.¹⁰

18 Os capilares usados têm geralmente de 25 a 75 cm de comprimento e o
19 diâmetro interno varia de 25 a 75 μm . O capilar é fixado em um dispositivo chamado
20 cassete, que controla a temperatura do capilar através de um fluxo de ar forçado. No
21 cassete também se encontra o alinhador, que fixa a janela de detecção.¹⁰

22 As amostras podem ser inseridas no capilar de maneira hidrodinâmica,
23 aplicando uma pressão no reservatório que contém o eletrólito e o capilar, ou de
24 maneira eletrocinética, onde a amostra é introduzida por aplicação de tensão
25 elétrica. O volume de amostra injetada é da ordem de nanolitros.¹⁰

O detector comumente utilizado na eletroforese capilar é o detector de absorvância no ultravioleta/visível (UV/Vis). Os compostos que serão analisados precisam apresentar características que permitam sua detecção, ou seja, apresentando transmitância respeitando a Lei de Lambert-Beer.¹⁵

A Lei de Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ (A é a absorvância, ϵ é a coeficiente de absorção molar característico do analito, b é o caminho óptico, c é a concentração da espécie absorvente) é uma lei matemática de absorção de radiação por analitos, tanto na região do infravermelho, quanto no visível e ultravioleta.¹⁵

2.3.2 *Peakmaster*

Como descrito no trabalho, a eletroforese capilar é uma técnica de separação que se baseia na mobilidade do analito. Essa separação depende da ionização das espécies, do pH do meio, do eletrólito a ser utilizado na corrida, etc. Uma das dificuldades da técnica é a determinação das condições ideais.^{4,10} Essas determinações podem ser feitas de maneira experimental, ou seja, tentativa e erro, com base nas propriedades do analito. Porém, esse método pode ser exaustivo e demorado, pois são inúmeras variáveis que devem ser avaliadas, demandando grande tempo de uso do equipamento, além do uso de reagentes e amostras para realizar o experimento, mesmo sendo utilizados volumes muito baixos, na ordem de nanolitros.¹⁶

Outra maneira de determinar as condições ideais do método é através de um *software*, *Peakmaster*, que foi desenvolvido por Jaros (2004) para simulações de análises em eletroforese capilar. Valores tabelados para diversos compostos podem ser selecionados, sendo possível variar diversos parâmetros da corrida, como comprimento do capilar, tensão, polaridade, presença e força de um fluxo eletrosmótico, modo de detecção, etc. A corrida é simulada e o resultado é dado na forma de um eletroferograma simulado, juntamente com os dados de mobilidade efetivas e tempo de migração de cada espécie.^{16,17} Desta forma é possível testar várias condições experimentais, sem utilizar reagentes, evitando desperdícios e de maneira mais rápida.

2.3.3 Injeções Múltiplas

Nos últimos anos, com o aumento da “busca” por novos medicamentos, um dos objetivos de pesquisadores é a rápida análise dos novos compostos. Há uma crescente necessidade por técnicas de análise de alta produtividade, alta frequência analítica, e que os resultados possam ser interpretados de maneira ágil. Com essa alta quantidade de informações geradas pelo uso sequencial de técnicas analíticas, há uma grande demanda de tempo para tratamento de dados, ou seja, integração de picos, transferência dos dados para um *software* de tabelas, gráficos, etc.¹²

A eletroforese capilar, devido à possível mudança de diversos aspectos variáveis, é uma técnica que apresenta alto desempenho analítico comparado com outras técnicas. Uma das variáveis que podem ser exploradas é a análise de várias amostras na mesma corrida, uma injeção sequencial. Este tipo de estratégia é chamada de múltiplas injeções em uma única corrida experimental (MISER, do inglês *multiple injections in a single experimental run*). Este método permite que os resultados sejam interpretados de maneira mais fácil e rápida.¹⁸ O diferencial do MISER é que em um único eletroferograma têm-se múltiplos resultados, fazendo com que as conclusões e os resultados do método sejam obtidos mais rapidamente, sem que demande elevado tempo de trabalho.¹⁹

2.3.4 Microanálise Mediada por Eletroforese Capilar (EMMA)

A eletroforese capilar é uma técnica que exige quantidades mínimas de amostra, e é muito usada para estudar reações enzimáticas, para obtenção de dados cinéticos ou a identificação de inibidores enzimáticos. A caracterização e determinação da atividade enzimática é muito importante para o entendimento do processo metabólico mediado por enzimas.²

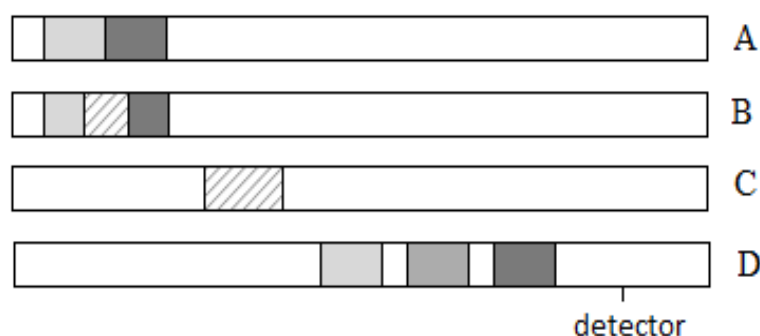
Certas enzimas estão relacionadas a doenças e, conseqüentemente, são estudadas para o desenvolvimento de novos fármacos. Os inibidores, por exemplo, são usados para que a enzima não desempenhe o seu papel no metabolismo, evitando algumas doenças ou sintomas relacionados.²

Há dois modos de análises de reações enzimáticas que são utilizados comumente em eletroforese capilar, pré-capilar e *in capilar*. No pré-capilar, a reação

é realizada em um recipiente, sendo necessários todos os componentes envolvidos na reação, como cofator, substrato, enzima, etc., e uma alíquota da solução é submetida à análise em eletroforese capilar para a identificação do produto e de todos os componentes envolvidos na reação. No segundo modo, *in capilar*, a reação é realizada no capilar, ou seja, a enzima, o cofator, substrato, etc., são injetados como plugues no capilar onde será realizada a corrida. Os plugues são misturados por difusão ou pela aplicação de um campo elétrico por curto período. Espera-se um período para que a reação ocorra e então se aplica a tensão necessária para a separação dos compostos.^{2,20} Esses ensaios realizados no capilar também são reconhecidos como microanálises mediadas por eletroforese capilar (EMMA, do inglês *electrophoretically mediated microanalysis*). Não só reações enzimáticas, como diversas outras reações podem ser estudadas através do EMMA. A maior vantagem de utilização desse método é o baixo consumo dos reagentes.²⁰

O EMMA está dividido em dois modos de injeção, o de longo contato, que o capilar é preenchido com um dos reagentes e o outro é injetado como um plugue; e o modo de curto contato ou plugue-plugue (Figura 2), que o tampão de incubação é o mesmo que o de corrida, neste caso o capilar é preenchido com o tampão (BGE, do inglês *background electrolyte*) e, então, a enzima e o substrato são injetados em plugues.^{21,22} O modo plugue-plugue é muito utilizado em EMMA pelo baixo consumo de reagentes, pois são injetados plugues de volume na ordem da nanolitros.²²

Figura 2. Demonstração do modo plugue-plugue clássico. (A) Plugues de reagentes. (B) Reagentes se misturam para gerar o produto. (C) Mistura de reagentes e produto. (D) Separação dos reagentes e do produto por diferença de mobilidade frente ao campo elétrico.



Fonte: Autora.

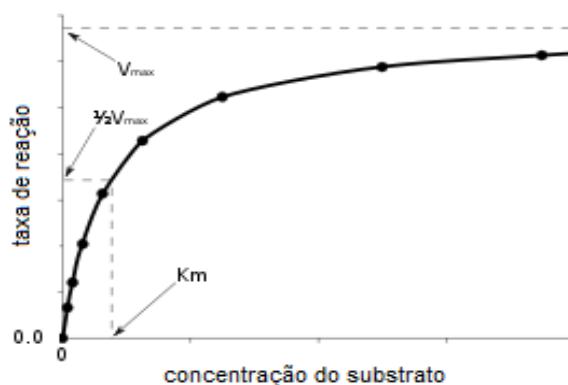
2.4 Parâmetros Cinéticos da Reação Enzimática

Um dos modelos mais conhecidos para determinação de parâmetros cinéticos enzimáticos é a cinética de Michaelis-Menten. Este modelo tem a forma de uma equação que relaciona a taxa de reação com a concentração de um substrato. Na equação de Michaelis-Menten (Eq. 1), V_0 é a velocidade inicial, V_{\max} é a velocidade que todos os sítios ativos da enzima estão ocupados pelo substrato, K_m é a constante de Michaelis, que é definida como a concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é a metade de V_{\max} , e $[S]$ é a concentração de substrato.²³

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Para a construção gráfica, utiliza-se variadas concentrações de substrato para cada concentração de inibidor estipulada. O eixo x do gráfico é a concentração de substrato e o eixo y é a taxa de reação como mostrado na figura 3.

Figura 3. Demonstração gráfica da equação de Michaelis -Menten.

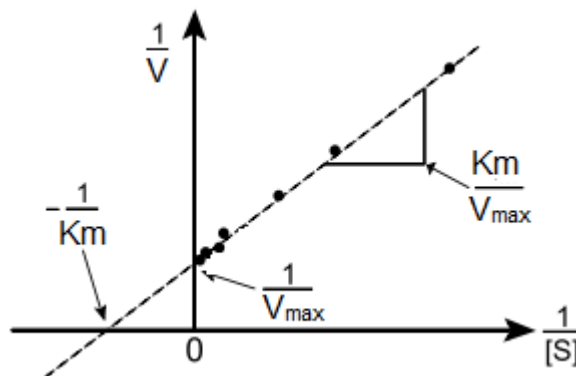


Fonte: Autora.

Com baixas concentrações de substrato o gráfico tem caráter linear, pois a velocidade da reação aumenta com o aumento da concentração de substrato. Com altas concentrações de substrato a velocidade da reação atinge um máximo, não dependendo mais da concentração do substrato, pois a enzima encontra-se em um estado saturado. Após atingir essa saturação, a velocidade da reação não se altera com o aumento da concentração de substrato, atingindo uma velocidade máxima de reação.²⁴

Para estimar os valores da K_m e de V_{max} de maneira mais fácil, foi desenvolvido um método de linearização da equação de Michaelis-Menten, onde pode-se calcular estas constantes cinéticas de maneira simples, dando origem ao gráfico de Lineweaver-Burk mostrado na figura 4.²⁷

Figura 4. Demonstração gráfica da equação de Lineweaver-Burk.



Fonte: Autora.

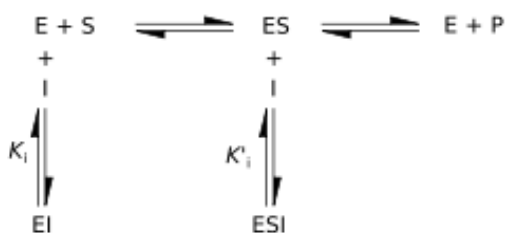
Para construção do gráfico de Lineweaver-Burk, tomam-se os valores inversos dos dois lados da equação de Michaelis-Menten, obtendo a equação 2.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

Com esta equação, pode-se calcular as constantes cinéticas da reação, que descrevem as características da enzima. V_{max} está relacionada com a capacidade de catalise da enzima, ou seja, relaciona-se com o número de renovação enzimática, e K_m que determina a “afinidade” da enzima com o substrato, quando maior o seu valor, menor a afinidade da enzima com o substrato.^{26,27}

Os inibidores são substâncias capazes de interferir na ação de uma enzima. Há duas formas nas quais os inibidores podem afetar uma reação enzimática. Na inibição reversível, como mostrado na figura 5, um inibidor pode ligar-se à enzima e ser liberado em seguida, deixando-a em sua condição inicial e um inibidor irreversível, se liga à enzima formando uma ligação covalente deixando-a inativa.²⁷

Figura 5. Mecanismo de inibição reversível.



Fonte: Autora.

Os inibidores reversíveis podem ser classificados como competitivos, incompetitivos, não-competitivos e mistos, segundo o efeito que produzem nas constantes cinéticas K_m e V_{max} .²⁴

Outro parâmetro que nos dá informações sobre a enzima e sobre o inibidor a ser estudado é a metade da concentração inibitória máxima ou IC_{50} . A IC_{50} é uma medida da potência de uma substância na inibição de uma função biológica específica.^{24,27}

Para calcular a IC_{50} (concentração na qual o inibidor irá inibir a enzima em 50% de sua atividade), usam-se diferentes valores de inibidor, para uma única concentração de substrato. O gráfico da IC_{50} é construído com os valores de log da concentração de inibidor no eixo x, e a porcentagem de inibição no eixo y, que é calculada com a equação 3.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\left(\frac{\frac{\text{área do produto}}{\text{área padrão interno}}}{\frac{\text{área prod CN}}{\text{área padrão interno CN}}} \right) \times 100 \right) \quad (3)$$

Na equação 3, as áreas são referentes ao eletroferograma da reação, CN é o controle negativo (reação sem o inibidor), e PI é o padrão interno.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de EMMA duplo para a determinação simultânea das atividades das enzimas AChE e α -Gli e aplicá-lo no estudo do potencial de inibição de compostos fenólicos frente às enzimas.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as condições experimentais (escolha do eletrólito, escolha do padrão interno, comprimento do capilar a ser utilizado, espaço entre as injeções das enzimas e escolha do pH do meio), para desenvolvimento do método de EMMA simultâneo.
- Construir gráfico de Michaelis-Menten.
- Construir gráfico de Lineweaver-Burk.
- Calcular constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$.
- Construir gráfico de inibição das enzimas por inibidores padrão e calcular IC_{50} .
- Aplicar o método proposto em compostos fenólicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Todos os reagentes que foram utilizados são de grau analítico. Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (EC.3.1.1.7), α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20), iodeto de acetiltiocolina, *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG), acarbose, metilsulfato de neostigmina, tetraborato de sódio anidro (TBS) e, ácido fórmico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), e metanol (MeOH) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), diidrogenofosfato de sódio monohidratado adquirido da Fischer Chemical Co. (Fair Lawn, NJ, EUA), ácido bórico e hidrogenofosfato de sódio anidro adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH) de Neon Comercial (São Paulo, SP, Brasil). Toda a água utilizada foi previamente desionizada usando um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

4.2 Instrumentação

Foi utilizado nos experimentos um sistema *Agilent*[®] CE 7100 (*Agilent Technologies*, Palo Alto, USA) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) e *software ChemStation* para controle, processamento e aquisição de dados. O capilar de sílica fundida que foi utilizado possui revestimento externo de poli-imida, diâmetro interno de 50 μ m e externo de 375 μ m, com comprimento de 48,5 cm (*Polymicro Technologies*, Phoenix, AZ, EUA). A temperatura do capilar foi ajustada em 37 °C e a tensão utilizada para a separação foi de 30 kV. A detecção foi realizada em comprimento de onda de absorção máxima dos produtos (230 nm para tiocolina e 406 nm para *p*-nitrofenolato) e de padrões internos (230 nm para propanolol e 298 nm para butilparabeno).

4.2.1 Peakmaster

Foi utilizado o *software Peakmaster* para simulação das análises que foram realizadas, variando os parâmetros da corrida, para uma determinação das condições ideais mais rapidamente. O *software* se mostrou muito útil para a otimização dos parâmetros, obtendo uma separação adequada dos analitos, sem

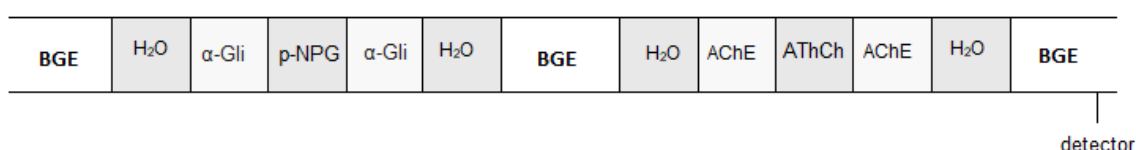
1 que fosse preciso repetir diversas análises experimentais para chegar em um
2 método ideal.¹⁶

3 4.3 Método

4 O método EMMA proposto tem o modo de injeção plugue-plugue, *in capilar*,
5 no modelo sanduíche como ilustrado na figura 6. Foi realizada análise simultânea
6 para as enzimas AChE e α -Gli em uma única corrida.

7

8 **Figura 6.** Esquema das injeções dos plugues no capilar para ensaio enzimático duplo
9 simultâneo das enzimas AChE e α -Gli.



10

11

Fonte: Autora.

12 O capilar foi condicionado antes das análises com hidróxido de sódio
13 (NaOH) 1 molL⁻¹, com H₂O e BGE, respectivamente, por 5 minutos cada.

14 As injeções dos plugues foram feitas de maneira hidrodinâmica. Primeiro é
15 injetado um plugue de H₂O (20 mbar por 5 segundos), para que o BGE da corrida
16 não interfira na reação da enzima com o substrato, depois é injetado AChE (50 mbar
17 por 5 segundos), AThCh (50 mbar por 5 segundos) com ou sem inibidor, AChE
18 novamente para garantir a reação da enzima com substrato e H₂O para separar a
19 reação do BGE. Como espaçador entre as duas reações, foi injetado BGE (50 mbar
20 por 10 segundos). Após é injetado H₂O, α -Gli (50 mbar por 5 segundos), p-NPG (50
21 mbar por 5 segundos) com ou sem inibidor, α -Gli, H₂O e BGE (50 mbar por 30
22 segundos). Os plugues de enzima e substrato se misturam por difusão. Após as
23 injeções, espera-se 2 minutos para que a reação ocorra, e depois é aplicada uma
24 tensão de 30 kV para que ocorra a separação dos analitos.

25 As enzimas foram preparadas a 10 unidades por mL. A AThCh é utilizada a
26 5 mmolL⁻¹, prepara-se uma solução a 100 mmolL⁻¹ pesando 0,0145g de iodeto de
27 acetiltiocolina e solubilizando em 0,5 mL de borato-fosfato 30 mmolL⁻¹. O p-NPG foi
28 utilizado a 1 mmolL⁻¹, prepara-se uma solução a 10 mmolL⁻¹ pesando 0,0151g de p-

1 nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo e solubilizado em 5 mL de fosfato 40 mmolL⁻¹. O
2 fosfato 40 mmolL⁻¹ é preparado com NaH₂PO₄ 30 mmolL⁻¹ e Na₂HPO₄ 10 mmolL⁻¹.

3 O BGE de corrida foi o borato-fosfato 30 mmolL⁻¹, com o pH ajustado para
4 8,0. Prepara-se usando ácido bórico 30 mmolL⁻¹ e NaH₂PO₄ 30 mmolL⁻¹, e o pH é
5 ajustado com NaOH 1 molL⁻¹.

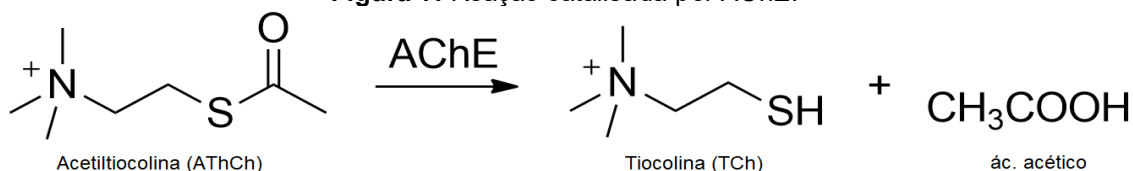
6 Para a microanálise da AChE, foi utilizado como substrato acetiltiocolina
7 (AThCh), por ter mais estabilidade que a acetilcolina (ACh) e seu produto (TCh) ter
8 absorção em 230 nm. Como cofator da AChE, foi utilizado sulfato de magnésio
9 (MgSO₄) anidro a 20 mmolL⁻¹. Como padrão interno foi utilizado propanolol a 25
10 mgL⁻¹ (uma vez que o padrão interno deve ser utilizado para corrigir erros de injeção
11 hidrodinâmica). Como inibidor padrão foi utilizada a neostigmina. O eletrólito utilizado
12 para preparação e diluição dos analitos e reagentes da AChE, foi o borato-fosfato 30
13 mmolL⁻¹ com pH 8,0, por ser o pH em que a enzima tem melhor desempenho de
14 reação.

15 A reação realizada experimentalmente é mostrada na figura 7.

16

17

Figura 7. Reação catalisada por AChE.



18

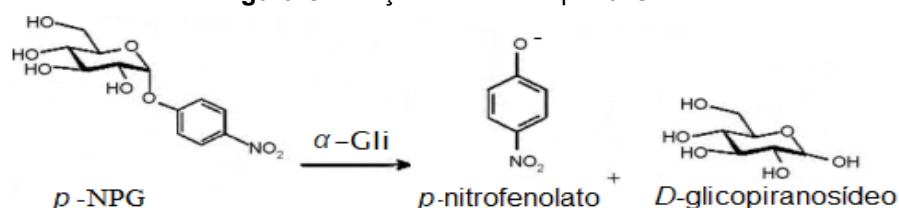
19

Fonte: Autora.

20 Para a microanálise da α -Gli, foi utilizado como substrato *p*-nitrofenil- α -D-
21 glicopiranosídeo (*p*-NPG). Como padrão interno foi utilizado butilparabeno a 25
22 mgL⁻¹. Como inibidor padrão foi utilizado acarbose. O eletrólito utilizado para
23 preparação e diluição dos analitos e reagentes da α -Gli foi o fosfato 40 mmolL⁻¹
24 com pH 6,8, por ser o pH em que a enzima tem maior atividade catalítica.

25 A reação realizada experimentalmente é mostrada na figura 8.

Figura 8. Reação catalisada por α -Gli.



Fonte: Autora.

4.4 Resíduos

A grande vantagem de usar a eletroforese capilar como ferramenta de análise é o fato de usar baixos volumes de reagentes, não gerando então volumes significantes de resíduos.

No desenvolver deste trabalho foi utilizado um capilar com o comprimento de 48,5 cm, com diâmetro interno de 50 μm . Calculando o volume interno do capilar:

$$V = \pi \times R^2 \times h = \pi \times (25 \times 10^{-6})^2 \times 0,485 = 9,523 \times 10^{-10} \text{ m}^3 = 0,952 \mu\text{L}$$

Para preencher o capilar utiliza-se menos que 1 μL , que é um valor desprezível.

As soluções foram preparadas em vials com volumes de 500 μL . Não foram utilizados volumes consideráveis de solventes orgânicos.

O método mostra-se quimicamente verde, por gerar resíduos em volumes insignificantes e condizer com alguns dos conceitos da química verde.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Método

O método proposto é baseado em dois métodos simples, propostos por MARTÍN-BIOSCA et al. (2009) e GUO et al. (2010). Com a junção destes métodos, e com algumas alterações, pôde-se desenvolver o método duplo de microanálise, facilitando o *screening* de inibidores para as duas enzimas simultaneamente.

No método foi utilizado eletrólito de corrida o borato-fosfato 30 mmolL⁻¹. O borato-fosfato era utilizado como eletrólito de corrida no método simples para a AChE com pH 8,0. No método da α -Gli era utilizado como eletrólito de corrida o tetraborato de sódio (TBS) com pH 9,2. Como o borato-fosfato tem o pH aproximado do TBS, escolheu-se usá-lo pois mesmo com o pH mais baixo, o BGE borato-fosfato promoveu a separação de todos os analitos das duas enzimas adequadamente. O efeito da concentração do BGE é pronunciado, sendo importante a utilização do pH adequado para as reações enzimáticas serem bem sucedidas.

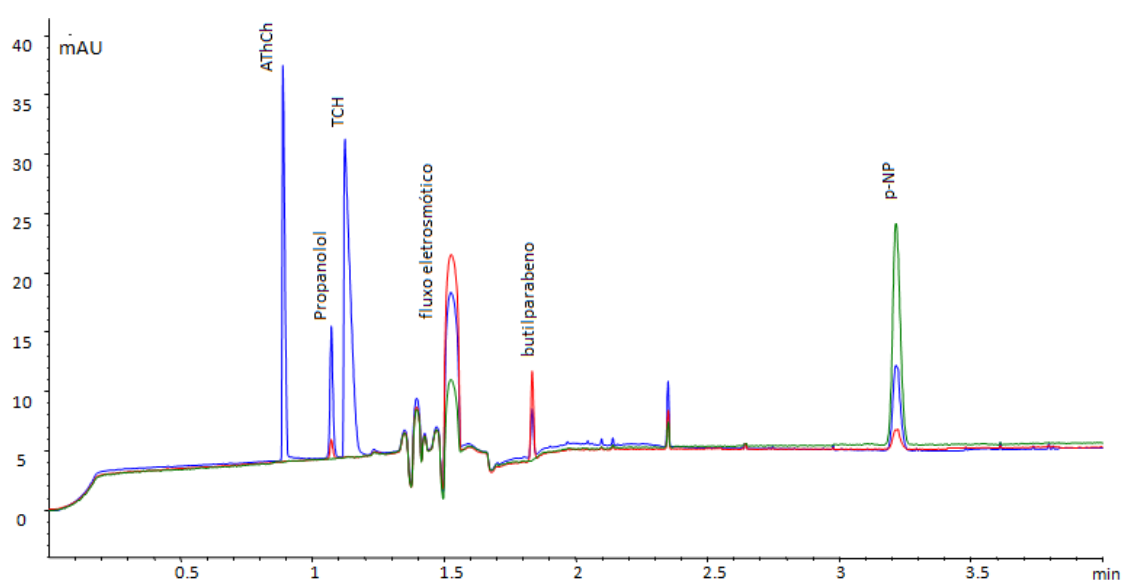
Por ser um método de EMMA duplo, procurou-se avaliar se o tamanho do capilar que foi utilizado no método simples seria adequado. O capilar de 48,5 cm de comprimento não apresentou problemas e era comum entre os dois métodos simples. Mostrou-se de acordo para o método duplo, não prejudicando a separação dos analitos.

O propanolol foi utilizado como padrão interno no método para a enzima AChE, baseado no método simples de Siebert et al. (2018). Inicialmente foi utilizado o ácido cinâmico como padrão interno para a enzima α -Gli, baseado no método simples de GUO et al. (2010), porém houve sobreposição de picos com alguns fenólicos que foram testados. Após alguns testes, foi proposta a utilização de butilparabeno como padrão interno para a α -Gli, já que em pH 8,0, o butilparabeno possui uma mobilidade efetiva pequena, aparecendo no eletroferograma bem antes dos fenólicos, resolvendo os problemas de sobreposições de picos.

Como mostrado na figura 9, o método apresentou boa resolução, não tendo sobreposição de picos. As duas reações ficam separadas pelo fluxo eletrosmótico. Os picos referentes ao produto (TCh) e ao padrão interno (propanolol) da reação da AChE migram junto com o fluxo e aparecem antes do mesmo no eletroferograma, e

os picos referentes ao produto (*p*-NP) e ao padrão interno (butilparabeno) da reação da α -Gli migram contra fluxo e aparecem depois do fluxo eletrosmótico. Isso acontece porque o fluxo eletrosmótico vai em direção ao pólo negativo (cátodo), então as moléculas catiônicas (propanolol e TCh) são levadas pelo fluxo (aparecendo antes) e as moléculas aniônicas (butilparabeno e *p*-NP) que têm a mobilidade contra o fluxo, aparecem depois.

Figura 9. Eletroferograma do método duplo simultâneo para as enzimas AChE e α -Gli. Condições experimentais: capilar de sílica fundida 50 μ m e 48,5 cm de comprimento, BGE borato-fosfato 30 mmolL⁻¹ (pH 8,0), AChE 10 U.mL⁻¹, [AThCh] 5 mmolL⁻¹, MgSO₄ 20 mmolL⁻¹ na solução de AThCh como cofator, propanolol 25 mgL⁻¹, α -Gli 10 U.mL⁻¹, [*p*-NPG] 1 mmolL⁻¹, butilparabeno 25 mgL⁻¹, temperatura do capilar 37 °C, voltagem da corrida 30 kV, comprimentos de onda detectados 230, 298, e 406 nm, tempo de incubação 2 min.



Fonte: Autora.

O método mostrou-se adequado, com um tempo de análise de 4 minutos pode-se obter os resultados de inibição para as duas enzimas, com uma boa resolução e com um bom eletroferograma.

Os comprimentos de onda que foram utilizados para monitoramentos dos produtos da reação e dos padrões internos foram: 230 nm para propanolol e TCh, 298 nm para butilparabeno e 406 nm para *p*-NP.

5.2 Parâmetros Cinéticos

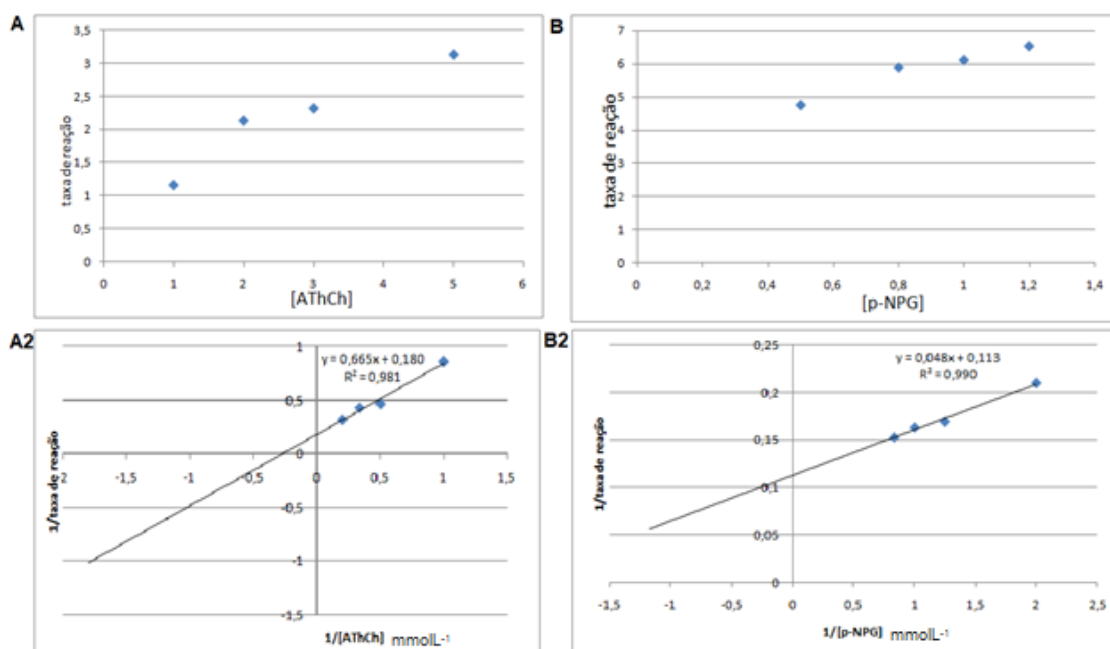
Para melhor confiabilidade do método e para estudo das reações enzimáticas, foram avaliados os parâmetros cinéticos das enzimas, modos de inibição dos inibidores estudados, constantes cinéticas K_m , V_{max} , e IC_{50} das enzimas.

5.2.1 Constantes Cinéticas K_m e V_{max}

Para determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max} , construiu-se o gráfico de Michaelis-Menten (figura 10, A e B). Para a construção gráfica, utilizou-se variadas concentrações de substrato. Para a AChE utilizou-se concentrações de AThCh de 0,2 - 5 mmolL⁻¹ e para a α -Gli utilizou-se concentrações de *p*-NPG de 0,1 - 1,2 mmolL⁻¹.

Para calcular K_m e V_{max} de maneira simples, usou-se a linearização do gráfico de Michaelis-Menten, dando origem ao gráfico de Lineweaver-Burk (figura 10, A2 e B2).

Figura 10. Na parte superior gráfico de Michaelis-Menten (A e B) e na parte inferior gráfico de Lineweaver-Burk (A2 e B2) correspondente para a reação de inibição enzimática de AChE (A/A2) Concentrações de AThCh de 0,2 – 5 mmolL⁻¹ e α -Gli (B/B2) Concentração de *p*-NPG de 0,1 – 1,2 mmolL⁻¹. Condições experimentais descritas na figura 9.



Fonte: Autora.

Com os valores das equações de reta obtidas através da linearização de Lineweaver-Burk, pôde-se calcular os valores das constantes cinéticas K_m e V_{max} .

O valor da K_m calculado para a AChE foi de $3,69 \text{ mmolL}^{-1}$ e segundo o estudo de Roy e Chaudhuri (2006), que utiliza diferentes partes da cabeça de ratos para determinação da K_m , os valores calculados variam de $2,631$ à $6,660 \text{ mmolL}^{-1}$ dependendo da parte da cabeça utilizada. K_m é considerado o inverso de uma medida de afinidade entre a enzima e o substrato. Quanto mais baixo for a K_m maior a afinidade. Entende-se que o substrato apresentou afinidade adequada com a enzima. O valor obtido experimentalmente para a constante de Michaelis condiz então com os valores da literatura.³⁵

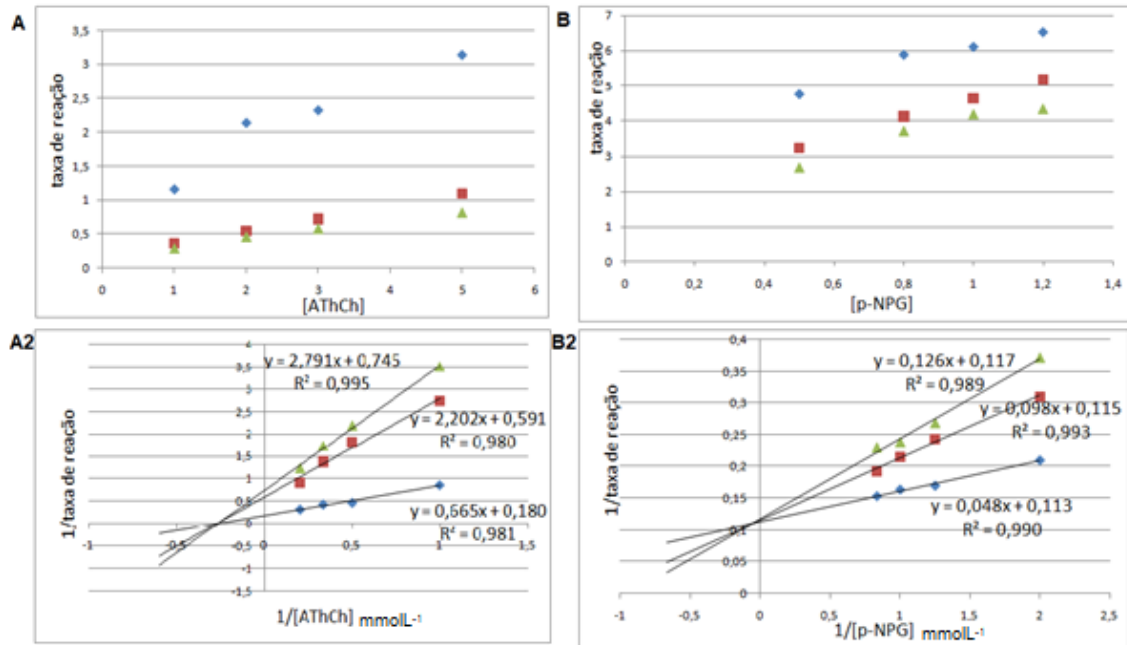
Para a α -Gli o valor calculado da K_m foi de $0,42 \text{ mmolL}^{-1}$. O valor é próximo ao valor da literatura⁴ que é de $0,63 \text{ mmolL}^{-1}$, mostrando que a reação ocorreu de maneira coerente como era esperado.

5.2.2 Parâmetros de Inibição

Para avaliar os parâmetros de inibição, verifica-se como variam as constantes cinéticas com o aumento da concentração de inibidor.

Para determinação do modo de inibição dos inibidores neostigmina e acarbose, construiu-se o gráfico de Michaelis-Menten (figura 11, A e B). Para a construção gráfica, utilizou-se variadas concentrações de substrato para cada concentração de inibidor estipulada. Para a AChE utilizou-se concentrações de AThCh de $0,2 - 5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e concentração de neostigmina de $0, 15$ e $30 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Para a α -Gli utilizou-se concentrações de p -NPG de $0,1 - 1,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ e acarbose de $0, 0,3$ e $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Figura 11. Na parte superior gráfico de Michaelis-Menten (A e B) e na parte inferior gráfico de Lineweaver-Burk (A2 e B2) correspondente para a reação de inibição enzimática de AChE (A e A2) e α -Gli (B e B2). (A) Concentrações de AThCh de 0,2 – 5 mmolL⁻¹ e α -Gli e de neostigmina 0 (verde), 15 (vermelho) e 30 μ molL⁻¹ (azul). (B) Concentração de p-NPG de 0,1 – 1,2 mmolL⁻¹ e de acarbose 0 (verde), 0,3 (vermelho) e 0,6 mmolL⁻¹ (azul). Condições experimentais descritas na figura 9



Fonte: Autora.

Para avaliar os mecanismos de inibição, verifica-se como variam as constantes cinéticas com o aumento da concentração de inibidor. Os valores das constantes calculadas são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores de K_m e V_{max} , referentes às equações apresentadas na figura 11.

	V_{max}	K_m
AChE	5,56 (sem inibidor)	3,69
	1,68 (15 μ molL ⁻¹ neostigmina)	3,73
	1,34 (30 μ molL ⁻¹ neostigmina)	3,75
α-Gli	8,85 (sem inibidor)	0,42
	8,70 (0,3 mmolL ⁻¹ acarbose)	0,85
	8,55 (0,6 mmolL ⁻¹ acarbose)	1,08

Fonte: Autora.

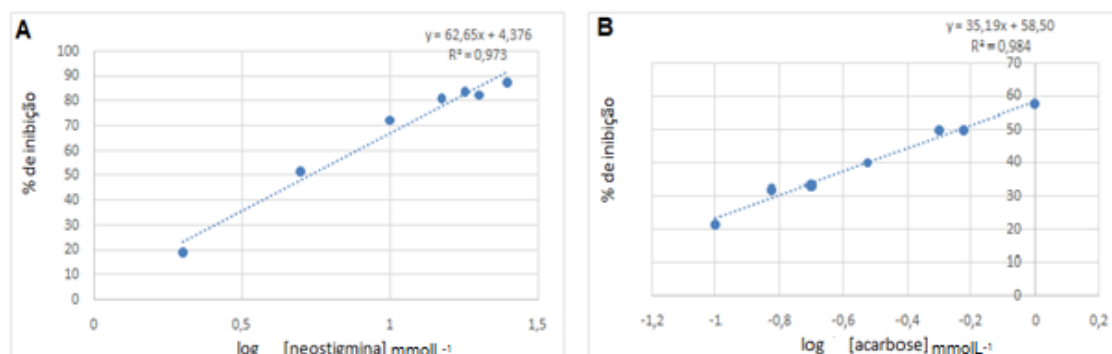
Com o aumento da concentração de neostigmina, há uma diminuição dos valores de V_{max} da AChE e os valores da K_m pouco variam. Isso indica que nesta reação a neostigmina tem o caráter de inibidor não-competitivo, ou seja, não

interfere na ligação do substrato no sítio ativo da enzima. O inibidor e o substrato não estão competindo pelo mesmo sítio, a neostigmina liga-se à enzima de forma a não ocupar o sítio ativo, porém não deixando com que haja formação do produto da reação. Como a K_m é uma medida de afinidade entre enzima e substrato, neste caso K_m não se altera, pois o substrato continua interagindo com o sítio ativo da enzima. Para uma concentração qualquer de inibidor, uma parte da enzima fica na forma de um complexo ternário enzima-substrato-inibidor (ESI), então a V_{max} aparente é menor do que V_{max} .²⁶ Segundo Abbasi et al. (2018) a neostigmina tem caráter de inibição competitiva, divergindo com o resultado apresentado. Essa diferença pode ser devido ao método apresentar interferências que não deixam o inibidor atuar de forma tradicional, prejudicando a sua interação com o sítio ativo da enzima. Essas interferências podem ser causadas pela má difusão dos plugues, não obtendo uma mistura efetiva dos reagentes.

A acarbose apresentou característica de um inibidor competitivo, condizendo com a literatura⁴, pois os valores de V_{max} não apresentaram variação considerável e os valores de K_m tiveram um aumento (tabela 1). Na inibição competitiva o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, fazendo com que a constante de formação de enzima-substrato (ES) diminua, aumentando o valor de K_m devido a formação do complexo enzima-inibidor (EI).^{25,27}

Para a determinação da IC_{50} da neostigmina frente à AChE, foram utilizadas concentrações de neostigmina de 2 – 30 μmolL^{-1} , mantendo o substrato a 3,0 mmolL^{-1} . E para a IC_{50} da acarbose frente à α -Gli foram utilizadas concentrações de acarbose de 0,1 – 1,0 mmolL^{-1} , com o substrato a 0,4 mmolL^{-1} . Os gráficos foram plotados com o log da concentração do inibidor versus a porcentagem de inibição, como mostrado na figura 12.

Figura 12. Gráfico de IC_{50} (A) neostigmina com concentrações de 2 – 30 μmolL^{-1} frente à AChE e (B) acarbose com concentrações de 0,1 – 1,0 mmolL^{-1} frente à $\alpha\text{-Gli}$. Condições experimentais como descritas na figura 9.



Fonte: Autora.

Através do gráfico podem-se calcular os valores de IC_{50} para as enzimas. A IC_{50} da neostigmina frente à AChE foi 5,35 μmolL^{-1} , o dobro do valor descrito por Abbasi et al. (2018) ($2,038 \mu\text{molL}^{-1} \pm 0,039 \mu\text{molL}^{-1}$). Ou seja, para o método foi necessário utilizar duas vezes o valor descrito pela literatura de concentração de neostigmina para que 50% dos sítios ativos da enzima fossem ocupados, condizendo com os parâmetros de inibição já avaliados anteriormente através do método proposto.

A IC_{50} da acarbose frente à $\alpha\text{-Gli}$ foi 0,57 mmolL^{-1} , um valor inferior ao descrito por Iqbal et al. (2013) ($0,97 \text{ mmol.L}^{-1} \pm 0,11 \text{ mmolL}^{-1}$). Por ser um inibidor competitivo, o valor condiz com a interação mais efetiva entre inibidor-enzima, mostrando que há uma alta afinidade entre os mesmos. Porém, segundo Yang et al. (2016), o valor de IC_{50} da acarbose frente à $\alpha\text{-Gli}$ é 0,62 mmol.L^{-1} , condizendo com os valores obtidos por este trabalho.

5.3 Compostos Fenólicos

Nosso grupo de pesquisa começou a fazer ensaios enzimáticos com os métodos de microanálise simples, analisando a possível inibição enzimática por sucos de frutas liofilizados. Os sucos apresentaram certa inibição frente às enzimas. Como os sucos eram constituídos por diversos compostos fenólicos, decidiu-se verificar se esses fenólicos presentes nos sucos eram responsáveis pela inibição enzimática.

Nasce então o interesse em fazer o método duplo simultâneo para esse *screening*, pois além de ser um método novo, seria útil para o estudo de maiores quantidades de fenólicos ou de amostras variadas.

A partir da biblioteca de fenólicos do laboratório, foram selecionados alguns dos fenólicos que estavam presentes em maior quantidade nos sucos para serem analisados, e os mesmos apresentaram inibição como mostra a tabela 2.

Os fenólicos foram usados a 10 mgL^{-1} , solubilizados em metanol. São injetados junto com o substrato como descrito no método de injeção.

Tabela 2. Porcentagem de inibição dos fenólicos frente às enzimas AChE e α -Gli.

Fenólicos (10 mgL^{-1})	% inibição	
	AChE	α -Gli
Ácido Gálico	$7,18 \pm 2,3$	$14,10 \pm 5,5$
Quercetina	$23,44 \pm 3,8$	$46,53 \pm 4,9$
Ácido Sinápico	$34,07 \pm 3,0$	$4,76 \pm 2,0$
Ácido Salicílico	$30,57 \pm 1,7$	$10,52 \pm 1,9$
Vanilina	$31,96 \pm 1,8$	$4,28 \pm 0,8$
Ácido Clorogênico	$29,8 \pm 4,7$	$6,86 \pm 6$
Ácido Elágico	$35,82 \pm 2,3$	$43,75 \pm 6,8$
Ácido protocatecuico	$36,22 \pm 1,2$	$3,79 \pm 1,1$
Ácido <i>p</i> -cumárico	$40,14 \pm 4,7$	$16,89 \pm 0,5$
Taxifolina	$29,71 \pm 3,3$	$15,10 \pm 3,4$
Neostigmina (10 mgL^{-1})	$39,30 \pm 3,7$	-
Acarbose (300 mgL^{-1})	-	$45,60 \pm 3,2$

A neostigmina e a acarbose foram utilizadas como inibidores padrão e para controle positivo da reação.

Como mostra a tabela, os fenólicos que mais apresentaram inibição frente à AChE são o ácido protocatecuico e o ácido *p*-cumárico.

Um estudo avaliou os possíveis mecanismos de proteção do ácido protocatecuico (PCA) contra o estresse oxidativo induzido pelo cádmio (Cd) e a neurotoxicidade em ratos. Também averiguou que o ácido protocatecuico foi o fenólico que melhor inibiu a enzima AChE, observando que pode proteger contra a neurotoxicidade induzida pelo cádmio, alterando as atividades da $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e enzimas antioxidantes endógenas.³²

O estudo “*Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors*” é o primeiro a lidar com a identificação de inibidores de AChE e BChE em maltes de cevada e trigo, e segundo Szwajgier e Borowiec (2012), o ácido *p*-cumárico é o fenólico que melhor inibe a AChE.³⁰

Os fenólicos que apresentaram maior inibição frente à α -Gli são a quercetina e o ácido elágico. O trabalho de Watanabe et al. (1997) mostra a inibição de quercetina frente à α -Gli em trato gastrointestinal de mamíferos,³¹ condizendo com resultados obtidos nos testes *in vitro* deste trabalho. Outro trabalho relevante para comparação é o “*Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities*”, que ressalta a inibição de quercetina e ácido elágico como bons inibidores frente à α -Gli.³⁴

Por fim, o artigo “ *α -Glucosidase Inhibitors Ellagic Acid Derivatives with Immunoinhibitory Properties from Terminalia superba*”, verificou que o fracionamento das cascas de caule de *Terminalia superba* produzia dois novos derivados de ácido elágico e esses compostos mostraram uma atividade de inibição significativa na α -glucosidase e possuíam atividades imunoinibitórias sem efeitos citotóxicos.³³

Nota-se que o ácido protocatecuico tem a estrutura semelhante à estrutura do ácido *p*-cumárico, tendo apenas um anel aromático e com pesos moleculares de 154 g mol^{-1} e 164 g mol^{-1} respectivamente. Os inibidores em maior potencial para a α -Gli

1 se assemelham também em termos de estrutura, sendo maiores estruturalmente e
2 com massas molares em torno de 302 g mol^{-1} .

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

6. CONCLUSÃO

O método simultâneo para as enzimas foi desenvolvido com sucesso, otimizando tempo e trabalho. O método pode ser utilizado para *screening* de novos possíveis inibidores.

Os parâmetros cinéticos foram aceitáveis. O valor da K_m calculado para a AChE sugere que a enzima apresentou afinidade adequada com o substrato. Para a α -Gli o valor calculado da K_m é próximo ao valor da literatura⁴ mostrando que a reação ocorreu de maneira coerente.

A neostigmina apresentou caráter de inibidor não-competitivo e a acarbose apresentou caráter de inibição competitivo. Os valores de IC_{50} da neostigmina frente à AChE e da acarbose frente à α -Gli foram calculados, condizendo com valores da literatura.

Os compostos fenólicos que apresentaram maior inibição na AChE foram os ácidos protocatecuico e *p*-cumárico. E os fenólicos que apresentaram maior inibição na α -Gli foram quercetina e o ácido elágico.

Por fim, o método desenvolvido mostrou-se adequado para a busca de novos inibidores em potencial para as enzimas AChE e α -Gli, e incentiva o avanço de pesquisas relacionadas à área.

7. REFERÊNCIAS

- ¹MACIEL, Maria Aparecida M. et al. PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.
- ²SCRIBA, Gerhard K. E.; BELAL, Fathalla. Advances in Capillary Electrophoresis-Based Enzyme Assays. **Chromatographia**, [s.l.], v. 78, n. 15-16, p.947-970, 4 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-015-2912-0>.
- ³ARAÚJO, Cleônia Roberta M.; SANTOS, Victória L. A.; GONSALVES, Arlan A.. Acetylcholinesterase - AChE: A Pharmacological Interesting Enzyme. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.1818-1834, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>.
- ⁴GUO, Li-ping et al. Screening α -glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 53, n. 5, p.1250-1253, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.07.041>.
- ⁵SIEBERT, Diogo A. et al. Determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretically-mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L. **Natural Product Research**. Aceito para publicação, no prelo. Nov. 2018.
- ⁶TANG, Zhong-mei; WANG, Zhao-yan; KANG, Jing-wu. Screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural extracts by CE with electrophoretically mediated microanalysis technique. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.360-365, fev. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200600327>.
- ⁷MARTÍN-BIOSCA, Yolanda et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitors by CE after enzymatic reaction at capillary inlet. **Journal Of Separation Science**, [s.l.], v. 32, n. 10, p.1748-1756, maio 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200800701>.
- ⁸ROSENBERRY, Terrone et al. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 12, p.2098-2105, 29 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22122098>.

- 1 ⁹LEBOVITZ, Harold E.. ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORS. **Endocrinology And**
2 **Metabolism Clinics Of North America**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.539-551, set. 1997.
3 Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0889-8529\(05\)70266-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0889-8529(05)70266-8).
- 4 ¹⁰SPUDEIT, Daniel Alfonso; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu.
5 Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, [s.l.], v. 4,
6 n. 4, p.287-297, 2012. Editora Cubo Multimidia.
7 <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.017>.
- 8 ¹¹TAVARES, Marina F. M.. ELETROFORESE CAPILAR: CONCEITOS
9 BÁSICOS. **Química Nova**, São Paulo, p.173-181, 1996.
- 10 ¹²WELCH, Christopher J. et al. MISER chromatography (multiple injections in a
11 single experimental run): the chromatogram is the graph. **Tetrahedron: Asymmetry**,
12 [s.l.], v. 21, n. 13-14, p.1674-1681, jul. 2010. Elsevier BV.
13 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2010.05.029>.
- 14 ¹³ASSUNÇÃO, Nilson Antonio et al. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria
15 de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n.
16 8, p.2124-2133, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000800037>.
- 17 ¹⁴JAGER, Alessandra V.; TAVARES, Marina F. M.. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA
18 DE CÁTIONS POR ELETROFORESE CAPILAR: FUNDAMENTOS E
19 APLICAÇÕES. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p.363-373, 2001
- 20 ¹⁵ROCHA, Fábio R. P.; TEIXEIRA, Leonardo S. G.. ESTRATÉGIAS PARA
21 AUMENTO DE SENSIBILIDADE EM ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS. **Química**
22 **Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p.807-812, jun. 2004.
- 23 ¹⁶JOHNS, Kara F. et al. Evaluation of Peakmaster for computer-aided multivariate
24 optimisation of a CE separation of 17 antipsychotic drugs using minimal experimental
25 data. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.839-847, mar. 2009. Wiley.
26 <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800532>.
- 27 ¹⁷JAROŁ, Michał et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone
28 electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 25, n.
29 1819, p.3080-3085, out. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200405982>.
- 30 ¹⁸CALCERRADA, M.; GONZÁLEZ-HERRÁEZ, M.; GARCÍA-RUIZ, C.. Successive
31 injection in microstructured-capillary electrophoresis for rapid pairwise comparisons.

- 1 Application to questioned documents. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 139, p.416-
2 423, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.022>.
- 3 ¹⁹PAPP, Robert; ANDERSSON, Ulrika; CANTIN, Louis-david. Evaluating MISER
4 chromatography for a rapid formulation screen. **Journal Of Pharmaceutical And**
5 **Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 77, p.94-99, abr. 2013. Elsevier BV.
6 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.016>.
- 7 ²⁰FAN, Yi; SCRIBA, Gerhard K.e.. Advances in-capillary electrophoretic enzyme
8 assays. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 53, n. 5,
9 p.1076-1090, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.04.005>.
- 10 ²¹LIU, Dong-mei; SHI, Yan-ping; CHEN, Juan. Application of Capillary
11 Electrophoresis in Enzyme Inhibitors Screening. **Chinese Journal Of Analytical**
12 **Chemistry**, [s.l.], v. 43, n. 5, p.775-782, maio 2015. Elsevier BV.
13 [http://dx.doi.org/10.1016/s1872-2040\(15\)60826-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1872-2040(15)60826-x).
- 14 ²²RAMANA, Pranov et al. Recent advances in CE mediated microanalysis for
15 enzymatic and derivatization reactions. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.56-65,
16 10 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201500300>.
- 17 ²³CAMARGO, Ademir João et al. **Processos Químicos: Aplicações Industriais da**
18 **Biotecnologia Enzimática**. Goiânia: Assessoria de Comunicação e Marketing do
19 Sistema Fieg, 2009. 3 v.
- 20 ²⁴ATKINS, P. W.; JONES, Loretta. **Princípios de química: questionando a vida**
21 **moderna e o meio ambiente**. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 965 p.
- 22 ²⁵MATOS, Maria Cristina Gomes; BRANCHTEIN, Leandro. O USO DE
23 ANTIDIABÉTICOS ORAIS NO PACIENTE COM DIABETES MELLITUS E DOENÇA
24 CARDÍACA. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, Porto
25 Alegre, v. 8, n. , p.1-4, maio 2006.
- 26 ²⁶MARQUES, Paulo Roberto Brasil de Oliveira; YAMANAKA, Hideko. Biossensores
27 baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, Araraquara, v. 31, n.
28 7, p.1791-1799, set. 2008.

- 1 ²⁷CAMPBELL, Mary K.; FARRELL, Shawn O.. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo:
2 Cengage Learning, 2007. 1 v.
- 3 ²⁸IQBAL, Shoaib et al. Development of a fast and efficient CE enzyme assay for the
4 characterization and inhibition studies of α -glucosidase inhibitors. **Journal Of**
5 **Separation Science**, [s.l.], v. 36, n. 21-22, p.3623-3628, 25 set. 2013. Wiley.
6 <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201300758>.
- 7 ²⁹ABBASI, Muhammad Athar et al. Synthesis, enzyme inhibitory kinetics mechanism
8 and computational study of N-(4-methoxyphenethyl)-N-(substituted)-4-
9 methylbenzenesulfonamides as novel therapeutic agents for Alzheimer's
10 disease. **Peerj**, [s.l.], v. 6, 26 jun. 2018. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4962>.
- 11 ³⁰SZWAJGIER, Dominik; BOROWIEC, Kamila. Phenolic acids from malt are efficient
12 acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Journal Of The Institute**
13 **Of Brewing**, [s.l.], v. 118, n. 1, p.40-48, 23 maio 2012. Wiley.
14 <http://dx.doi.org/10.1002/jib.5>.
- 15 ³¹WATANABE, Jun et al. Isolation and Identification of α -Glucosidase Inhibitors from
16 Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**,
17 [s.l.], v. 61, n. 1, p.177-178, jan. 1997. Informa UK Limited.
18 <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.61.177>.
- 19 ³²SA, Adefegha et al. Alterations of Na⁺/K⁺-ATPase, cholinergic and antioxidant
20 enzymes activity by protocatechuic acid in cadmium-induced neurotoxicity and
21 oxidative stress in Wistar rats. **Biomed Pharmacother**, [s.l.], p.559-568, out. 2016.
- 22 ³³TABOPDA, Turibio Kuate et al. α -Glucosidase Inhibitors Ellagic Acid Derivatives
23 with Immunoinhibitory Properties from Terminalia superba. **Chemical &**
24 **Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 56, n. 6, p.847-850, jun. 2008. Pharmaceutical
25 Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.56.847>.
- 26 ³⁴YANG, Dan et al. *Phenolics from strawberry cv. Falandi* and their antioxidant and α -
27 glucosidase inhibitory activities. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 194, p.857-863, mar.
28 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.091>.

- 1 ³⁵ROY, Rini; CHAUDHURI, Aditi Nag. Differential acetylcholinesterase activity in rat
- 2 cerebrum, cerebellum and hypothalamus. **Indian Journal Of Experimental**
- 3 **Biology**. Kolkata, p. 381-386. maio 2006.